

外加碳源的活性污泥合成生物降解塑料 PHAs 的试验

林东恩¹, 张逸伟¹, 韦朝海², 沈家瑞³ (1. 华南理工大学应用化学系, 广州 510640; 2. 华南理工大学化工学院; 3. 华南理工大学材料学院)

摘要:聚羟基脂肪酸酯(PHAs)是许多污泥微生物在不平衡生长条件下合成的细胞内能量和碳源储藏性物质,是一种新型的可完全生物降解的热塑性塑料.以污泥微生物作为 PHAs 的合成菌,采用乙酸钠、丙酸钠及丁酸钠作为单一碳源在好氧条件下合成得到占污泥干重 5.58%、3.90%及 4.98%的 PHAs 和在厌氧条件下合成得到占污泥干重 12.32%、9.55%及 11.35%的 PHAs.实验表明,污泥微生物里广泛存在 PHAs 合成菌,厌氧条件比好氧条件的 PHAs 产率要高;最佳的实验条件下得到 PHAs 的量占污泥干重的 12.32%,此时碳源转化率为 30.65%.此外,¹H NMR 谱图证明了同一污泥微生物用不同的碳源培养 PHAs 时其产物结构与组成均有变化.

关键词:聚羟基脂肪酸酯;生物降解塑料;活性污泥

中图分类号:X705 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2003)02-05-0097

Biodegradable Plastic Production by Activated Sludge with Different Carbon Sources

Lin Dongen¹, Zhang Yiwei¹, Wei Chaohai², Shen Jiarui³ (1. Department of Applied Chemistry, South China University of Science and Technology, Guangzhou 510640, China; 2. College of Chemical Engineering, South China University of Science and Technology, Guangzhou 510640, China; 3. College of Material, South China University of Science and Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters synthesized by numerous bacteria in sludge as intracellular carbon and energy storage compounds under the condition of unbalance growth. Another important aspect of PHAs is thermoplastic polyester with the remarkable characteristics of biodegradability. In this paper, using sodium acetate, sodium propionate and sodium butyrate as the unique carbon source, 5.58%, 3.90% and 4.98% PHAs of dry sludge weight were obtained by assimilated sludge as PHAs synthesis strains in the anaerobic condition, and 12.32%, 9.55% and 11.35% PHAs of dry sludge weight were obtained in the anaerobic condition. It was shown that there were large quantities strains which could accumulate PHAs as granules in the cytoplasm of cells, and the yield of PHAs in the anaerobic process were higher than that in the aerobic process. The best result was that 12.32% PHAs of dry sludge weight was obtained in the best experiment condition, and the yield of the PHAs to substrate was 30.65%. The structures of PHAs were analyzed by ¹H NMR spectrum, and the relationship of the structure of PHAs and the carbon source was explained.

Keywords: polyhydroxyalkanoates; biodegradable plastic; activated sludge

城市污水处理厂产生的污泥由于含有大量的有机物及丰富的微生物群,作为第二资源越来越受到人们的关注.我国的污水处理厂每年所产生的污泥有 1 亿 t 以上,大部分都采用焚烧或填埋的方法处理或处置,有效利用的不多.污泥有效利用的方法大致有以下 3 方面:作为肥料、土壤改良剂;消化污泥产生甲烷作为燃料;回收细菌中的蛋白质作为饲料.而以污泥作

为生物资源的处理利用方法鲜见报道^[1].在活性污泥的微生物群中,大部分细菌可以积累聚羟基脂肪酸酯之类的胞内聚合物.聚羟基脂肪

基金项目:国家自然科学基金项目(50278036).

作者简介:林东恩(1968~),女,讲师,博士.主要研究方向为废水生物处理资源化技术.

收稿日期:2002-04-02;修订日期:2002-05-22

聚酯(Polyhydroxyalkanoates, PHAs)是许多原核微生物在不平衡生长条件下合成的细胞内能量和碳源储藏性物质^[2],在污水生物处理中起着重要的作用.许多活性污泥细菌在营养物质不平衡的生长条件下积累 PHAs 而在营养物质平衡的情况下积累糖原、聚磷酸盐等,PHAs 扮演着“能量转化器”的角色^[3].另一方面,PHAs 是具有类似于化学合成塑料理化性质的一种可生物降解的新型热塑性聚酯塑料.研究开发降解塑料已成为全世界关注的热点,而 PHAs 被认为是替代化学合成塑料、减少白色污染最具潜力的一种新产品^[4-6].本文采用污泥中的微生物作为混合菌种,驯化后,增加有机基质为底物,研究合成 PHAs 的能力,并通过核磁共振谱分析所得 PHAs 的结构,探索活性污泥资源化利用的新方法.

1 实验部分

1.1 实验装置

使用自制的 SBR 反应器,配有磁力搅拌和曝气装置,总容积 2.5 L,有效容积 2 L.

1.2 实验材料

污泥:取自不同工厂已脱水的剩余污泥样品 A 及 B.

培养基(mg/L):硫酸铵 72;硫酸镁 89;氯化钙 17;氯化钾 70;磷酸二氢钾 60;蛋白胨 100;酵母浸出液 33.碳源分别是乙酸钠 500、丙酸钠 500 及丁酸钠 500 制成不同碳源的培养基:乙酸钠培养基、丙酸钠培养基及丁酸钠培养基.

1.3 实验方法

(1)污泥样品 A、B 直接提取 PHAs PHAs 的提取方法^[7]:将 10 g 的菌体污泥溶于 125 mL 的氯仿和 125 mL 的次氯酸钠水溶液里,搅拌 2 h 后离心,体系分 3 层,上面一层是次氯酸钠水溶液,中间一层是未完全破碎的细胞组织,下面一层是溶解了 PHAs 的氯仿溶液.分液,取氯仿层,蒸走大部分氯仿后,加入甲醇沉淀出白色 PHAs 颗粒,抽滤,风干.

(2)好氧条件下污泥 B 积累 PHAs 剩余污泥 B 先分别在乙酸钠培养基、丙酸钠培养基、

丁酸钠培养基中培养驯化 3 周,待到污泥适应了单底物环境时,控制溶解氧在 2.0 mg/L 条件下分别在 1 L 的 1 g/L 乙酸钠、丙酸钠及丁酸钠水溶液中好氧培养,分析菌体量与 PHAs 的含量随时间的变化.然后分别在 1 L 的 2 g/L 乙酸钠、丙酸钠及丁酸钠水溶液中好氧培养 2 h,分析 PHAs 的产量.

(3)厌氧条件下污泥 B 积累 PHAs 驯化过程同上,驯化后的污泥分别在 1 L 的 2 g/L 乙酸钠、丙酸钠及丁酸钠水溶液中厌氧培养 2 h,分析 PHAs 的产量和结构.

1.4 分析方法

(1)菌体量的测定 取发酵液 20 mL,离心 15 min,蒸馏水洗涤菌体,再次离心,将菌体移至恒重的称量瓶,90℃烘干至恒重.为快速简便起见,菌体量可用 OD_{600} 来表示,取 2 mL 发酵液,用蒸馏水稀释,采用 721 型分光光度计测定 600 nm 处的吸光度 A ,则 $OD_{600} = A \times m$ (m 为稀释倍数).

(2)PHAs 含量的测定(适用于聚 β -羟基脂肪酸酯) 取一定量的菌体(含 PHAs 5 ~ 50 μ g),破胞后用热氯仿抽提(PHAs 在氯仿层),蒸去氯仿,加入 10 mL 的浓硫酸,100℃中加热 10 min,冷却后用紫外分光光度计在 235 nm 处测量,再根据工作曲线确定 PHAs 的含量.

(3)PHAs 的结构分析 用核磁共振谱进行测定.

2 结果与分析

2.1 污泥 A、B 直接提取 PHAs

将污泥 A、B 未经处理直接提取 PHAs 的结果列于表 1 中.可以看出,这 2 种污泥均含有可积累 PHAs 的菌种,并且得到的 PHAs 结构类似,在 PHAs 中,除 PHB 是均聚物外,其余都是共聚物,其中最常见的是聚(3-羟基丁酸酯-co-3-羟基戊酸酯),简称为 P(HB-coHV),结构式如图 1 所示.污泥 A、B 所提取的 PHAs 的 $^1\text{H NMR}$ 如图 2 所示,在化学位移值为 1.24 ~ 1.25 处是 3 HB 链节的甲基峰,在 0.85 ~ 0.88 处为 3 HV 的甲基峰,因此从峰面积可以计算出 3 HB 3 HV

表 1 未经处理污泥提取 PHAs 的含量及其结构
Table 1 The content and structure of PHAs extracted
by activated sludge

污泥 样品	剩余污 泥量/ g	PHAs 的提 取量/ g	PHAs 的 含量/ %	PHAs 的结构/ %	
				3 HB	3 HV
A	10	0.092	0.92	92.82	7.17
B	10	0.134	1.34	93.90	6.09

的比例^[8]可见 PHAs 的积累菌普遍存在于生物污泥里,并不限于厌氧-好氧过程所产生的污泥,

由于污泥 B 的 PHAs 积累菌含量比污泥 A 高,所以采用剩余污泥 B 来进行本文以后的实验。
2.2 好氧条件下污泥 B 积累 PHAs 的情况

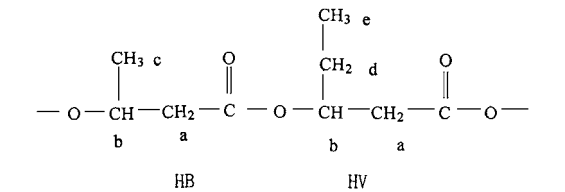


Fig.1 The structures of (3 HB-co-3 HV)

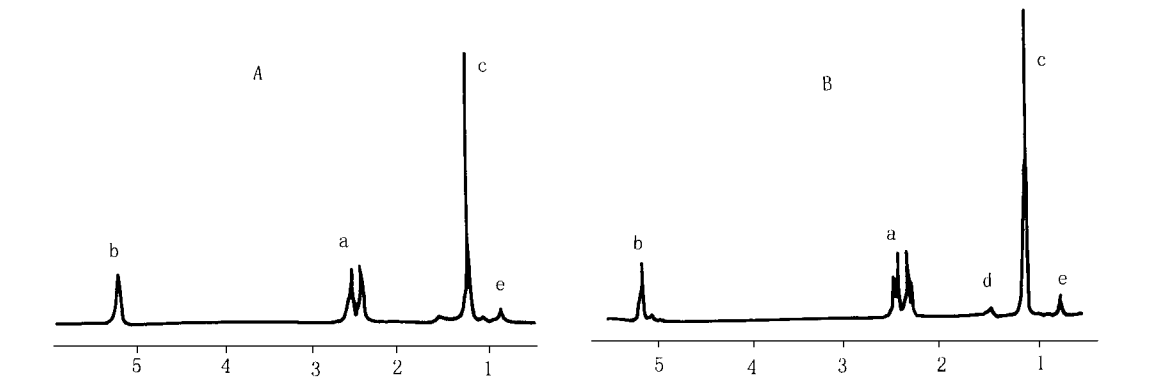


Fig.2 ¹HNMR of PHAs extracted from sludge A and B

污泥微生物在营养均衡的情况下吸收有机基质进行同化作用合成新的原生质如蛋白质、核酸等.蛋白质的合成需要氮元素的参与,核酸需要氮及磷元素的参与,如果氮及磷的含量降低,蛋白质、核酸的合成将难以进行,在这种营养不均衡的条件下,污泥微生物吸收有机基质转化成含碳储藏物质储藏起来,例如糖原、聚羟基脂肪酸酯等.所以,提高体系中碳氮比和碳磷比,将会提高 PHAs 的积累量.实验中采用过量碳源以提高体系的 C/ N 比,实验表明,污泥吸收乙酸、丙酸及丁酸的速度有明显差异,在体内积累 PHAs 的速度也不一样,污泥吸收乙酸的速度和体内积累 PHAs 的速度最快.实验数据列于表 2 中.
由表 2 可以看出,在乙酸钠培养基培养驯化 3 周的污泥在 1 g/ L 乙酸钠水溶液中有个快速吸收小分子有机物的过程,污泥中的胞内物

如 PHAs 也快速增加,从一开始的 46 mg/ L 经过 1 h 之后达到 297 mg/ L,之后由于体系中碳源含量降低,PHAs 的含量也逐渐下降.继续曝气,体系中的碳源接近消耗完毕,细菌便进行内源呼吸,在内源呼吸中 PHAs 作为能源和碳源被消耗,因此含量越来越低.
由于丙酸钠和丁酸钠对菌体有一定的毒性,对细菌生长呈现一定程度的抑制作用,因此从菌体量 OD₆₀₀ 可以看出以乙酸钠作为碳源的菌体量比以丙酸钠、丁酸钠作为碳源的菌体量要高.而且用丙酸钠和丁酸钠作为碳源被活性污泥吸收比乙酸钠慢,PHAs 的含量在 3 h 之后达到最高,分别是 189 mg/ L 和 214 mg/ L,比以乙酸钠为碳源的活性污泥在 1 h 时所积累的 PHAs 的含量低.为了方便比较,选择 2 h 作为曝气时间,并且为了防止乙酸钠被吸收过快而出现 C/ N 比低的情况,把碳源浓度提高到 2 mg/ L,

表 2 好氧条件下污泥 B 积累 PHAs 的结果

Table 2 The results of PHAs accumulated by sludge B in the anaerobic condition

碳源	项目	培养时间/ h					
		0	1	2	3	4	5
乙酸钠	菌体量 OD ₆₀₀	8.73	8.89	9.20	9.17	8.96	8.60
	PHAs 的含量/ mg·L ⁻¹	46	297	184	116	50.4	17.3
丙酸钠	菌体量 OD ₆₀₀	8.72	8.78	8.88	8.84	8.67	8.46
	PHAs 的含量/ mg·L ⁻¹	37	117	156	189	147	83
丁酸钠	菌体量 OD ₆₀₀	8.75	8.74	8.85	8.78	8.47	8.23
	PHAs 的含量/ mg·L ⁻¹	43	78.9	197	214	178	112

考察在不同碳源污泥微生物积累 PHAs 的情况,具体数据列于表 3 中.

表 3 好氧 2h 培养污泥在不同碳源下积累 PHAs

Table 3 The results of PHAs accumulated by sludge with different carbon source in the 2h aerobic condition

碳源	菌体干量/g	PHAs 的测定含量 ¹⁾ / mg·L ⁻¹	PHAs 的提取量 ²⁾ / g	碳源转化率 ³⁾ / %	PHAs/菌体干重 / %
乙酸钠	5.678	397	0.317	15.85	5.58
丙酸钠	4.076	203	0.159	7.95	3.90
丁酸钠	4.854	321	0.242	12.1	4.98

1) PHAs 的测定含量是指采用紫外分光法的测量结果;
2) PHAs 的提取量是指采用 2.3 方法从活性污泥里提取出来的 PHAs 的量; 3) 碳源转化率是指 PHAs 的提取量与添加碳源的比值.

2.3 污泥 B 驯化后采用不同的碳源厌氧条件下积累 PHAs

在活性污泥中,有一部分的细菌在厌氧环境下,分解自身的多磷酸盐获得能量然后吸收低分子的有机酸类化合物,合成 PHAs 储藏在体内.如果转化为好氧环境,这些细菌会消耗体内的 PHAs 而过度吸收溶磷,从而达到生物除磷的目的.这类细菌在厌氧-好氧生物除磷过程中起着重要作用,统称为聚磷菌.现在大量的实验研究证明聚磷菌包括:不动杆菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、棒杆菌属、肠杆菌属、着色菌属、脱氮微球菌等,而这些细菌同样存在于传统的活性污泥系统中^[3].由此可见,聚磷微生物广泛存在于生物污泥里,显然由于这类细菌的存在,使活性污泥在厌氧条件下的 PHAs 积累量提高,如表 4 所示.但是,由于厌氧条件下好氧细菌、兼性细菌的生长受到限制,所以菌种量减少.

3 种碳源培养出来的 PHAs 的¹HNMR 谱图

表 4 厌氧 2h 培养污泥在不同碳源中积累 PHAs

Table 4 The results of PHAs accumulated by sludge with different carbon source in the 2h anaerobic condition

碳源	菌种干量/g	PHAs 的提取量/g	PHAs 含量/ %	转化 率/ %	PHAs 的结构/ %	
					3 HB	除 HB 外的其它单体
乙酸钠	4.973	0.613	12.32	30.65	88.57	11.43
丙酸钠	3.541	0.338	9.55	16.9	10.08	89.92
丁酸钠	4.784	0.543	11.35	27.15	81.74	18.26

列于图 3 中的(2)、(3)及(4)并与文献[8]的谱图进行比较,实验结果表明,活性污泥能够在不同的碳源培养下合成不同结构的 PHAs,采用乙酸为底物时碳源转化率最高,单体链节绝大部分是 3HB.采用丙酸为碳源时转化率最低,只有 16.9%,并且单体链节以 3HV 为主.丁酸为底物的情况介于两者之间,合成 PHAs 的结构是以 3HB 单体链节为主,其他单体链节为辅的共混共聚物.对于真养产碱杆菌纯种培养发酵生成的 PHAs,在以乙酸或丁酸为底物时,只生成 PHB 而不生成 P(3HB-co-3HV),也就是说在这种条件下,真养产碱杆菌纯种培养时没有 3HV 的生成.由于这些剩余污泥未经处理直接提取的 PHAs 就发现有 3HV 链节,由此认为,活性污泥里含有可以通过双数碳的基质合成 PHV 的菌种.

从图 3 还可以看出,采用乙酸(盐)作为碳源所得到的 PHAs 主要是 PHB,而采用丙酸钠、丁酸钠作为碳源所得到的 PHAs,除了 3HB、3HV 链节之外,可能还有其他链节,从¹HNMR 谱图上均可以看出在化学位移为 1.1 左右有峰出现,进一步的分析需要¹³CNMR 谱图、气相色谱-质谱等共同确定.

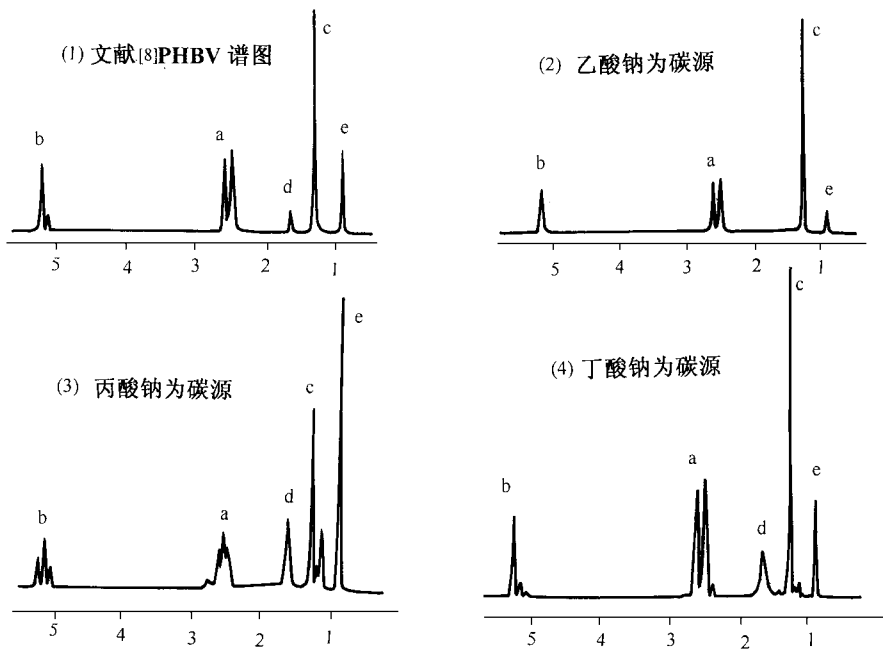


图 3 不同碳源所合成的 PHAs 的¹H NMR 谱图

Fig. 3 ¹H NMR spectrum of PHAs by sludge synthesized with different carbon sources

3 结 论

PHAs 既是完全可生物降解的新型材料,又是一部分污泥微生物临时储藏能源和碳源的胞内聚合物.本文用外加碳源的方法探讨了生物污泥作为微生物源合成 PHAs 的可能性,剩余污泥经驯化后于好氧条件下采用乙酸钠、丙酸钠及丁酸钠作为碳源合成 PHAs,分别得到占污泥干重 5.58 % 3.90 % 及 4.98 % 的 PHAs,而厌氧条件下由于污泥中有一类聚磷微生物可以释磷产生能量吸收小分子有机物从而加强体内积累 PHAs,因此产率有所提高,得到的 PHAs 分别占污泥干重 12.32 %、9.55 % 及 11.35 %.采用乙酸钠作为碳源所得到的 PHAs 主要是 PHB,而且碳源转化率较其它两者高.采用丙酸钠作为碳源所得到的 PHAs 主要是 PHV,碳源转化率较低.而采用丁酸钠作为碳源所得到的 PHAs 以 3HB 单体链节为主,3HV 链节为辅的共混共聚物.采用丙酸钠及丁酸钠作为碳源时可能存在其他单体链节,这有待进一步探讨.

参考文献:

1 韦朝海,陈传好.污泥处理、处置与利用的研究现状分析.

城市环境与城市生态,1998,11(4):10~13.

2 Lee SY. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng., 1996, 49(2): 1~14.
3 高廷耀,夏四清,周增炎.城市污水生物脱氮除磷机理研究进展.上海环境科学,1999,18(1):16~18.
4 Anderson A J, Dawes E A. Occurrence Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev., 1990, 54(4): 450~472.
5 Robert W Lenz, Richard A Gross, Helmut Brandt et al. Poly (β -hydroxyalkanoates): Natural biocompatible and biodegradable polyesters produced by bacteria. Chinese J. of Polymer Sci., 1989, 7: 289~298.
6 陈琦,黄和容,易祖华.微生物合成生物降解塑料研究现状与展望.微生物学通报,1994,21(5):297~303.
7 Hahn S K, Chang Y K, Kim B S et al. Communication to the editor optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44, 256~261.
8 Doi Y, Kunioka M, Nakamura Y et al. Nuclear magnetic resonance studies on poly (β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes euteophus* H16. Macromolecules, 1986, 19: 2860.